

CHARAKTERISIERUNG VON
ESCHERICHIA COLI-STÄMMEN,
DIE BEI DURCHFALLKRANKEN
HUNDEN ISOLIERT WURDEN

Michihiro Saito

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0016

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

CHARAKTERISIERUNG VON ESCHERICHIA COLI-STÄMMEN, DIE BEI
DURCHFALLKRANKEN HUNDEN ISOLIERT WURDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Michihiro Saito
aus
Tochigi
München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
"E.coli-Infektionskrankheiten des Hundes"	
2.1. <u>Infektionen der Harnwege</u>	2
2.1.1. Epidemiologie	2
2.1.2. Erreger	2
2.1.3. Klinik	3
2.1.4. Pathogenese	3
2.1.5. Diagnose	5
2.2. <u>Infektionen des Genitaltraktes (Hündin)</u>	5
2.2.1. Epidemiologie	5
2.2.2. Erreger	6
2.2.3. Klinik	6
2.2.4. Pathogenese	7
2.2.5. Diagnose	8
2.3. <u>Infektionen des Darmtraktes</u>	8
2.3.1. Epidemiologie	8
2.3.2. Erreger	9
2.3.3. Klinik	10
2.3.4. Pathogenese	11
2.3.5. Diagnose	12
2.4. <u>Infektionen der Prostata</u>	12
2.5. <u>Infektionen der Analdrüse</u>	13
2.6. <u>Sonstige E.coli-Infektionen</u>	13

	<u>Seite</u>
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
3.1. <u>Material und Methoden</u>	14
3.1.1. <u>Herkunft der Bakterienstämme</u>	14
3.1.2. <u>Anzüchtung und Isolierung</u>	14
3.1.3. <u>Bestimmung der O-Antigene</u>	15
3.1.3.1. Herstellung des Antigens	15
3.1.3.2. O-Antisera	15
3.1.3.3. Durchführung der Reaktion	15
3.1.3.4. Absorptionstest	16
3.1.4. <u>Hämagglutinationstest</u>	16
3.1.5. <u>Darmligaturtest</u>	17
3.1.6. <u>Zellkulturtest</u>	17
3.1.7. <u>Babymaustest</u>	18
3.1.8. <u>Sereny-Test</u>	18
3.2. <u>Ergebnisse</u>	20
3.2.1. <u>Nachweis von Hämolysinen</u>	20
3.2.2. <u>Nachweis von O-Antigenen</u>	20
3.2.3. <u>Nachweis von Fimbrien</u>	22
3.2.4. <u>Nachweis der Enterotoxinbildung</u>	22
3.2.4.1. Darmligaturtest	23
3.2.4.2. Babymaustest	24
3.2.4.3. Zellkulturtest	25
3.2.5. <u>Nachweis der Invasivität</u>	25
3.2.6. <u>Überblick</u>	25

	<u>Seite</u>
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	37
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
SUMMARY	44
6. LITERATURVERZEICHNIS	45

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren gelang es, einen Teil der als Durchfallerreger in Frage kommenden E.coli-Keime zu charakterisieren und damit von den "normalen" E.coli-Keimen des Dickdarms abzugrenzen. Bei diesen sogenannten "enterotoxischen" E.coli-Keimen (ETEC) werden spezifische Virulenzfaktoren (z. B. Enterotoxinbildung, Anheftungsfaktor) nachgewiesen, die die Voraussetzung für die Enteropathogenität dieser E.coli-Keime schaffen. Die bisherigen Ergebnisse basieren vor allem auf Untersuchungen mit bovinen, porcinen und humanen E.coli-Stämmen.

Die Erfahrungen mit E.coli-Stämmen des Hundes sind diesbezüglich noch relativ begrenzt. Es konnten zwar in einigen wenigen Arbeiten bekannte Virulenzfaktoren bei caninen E.coli-Stämmen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse blieben aber mehr oder weniger lückenhaft, und die Nachweishäufigkeit korrelierte nicht unbedingt mit den klinischen Erfahrungen und den Ergebnissen der bakteriologischen Routinediagnostik.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, bei caninen E.coli-Stämmen Virulenzfaktoren bzw. Eigenschaften nachzuweisen, mit denen in der Routinediagnostik eine Trennung zwischen pathogenen und physiologischen E.coli-Keimen möglich wird. Im einzelnen wurden bei E.coli-Stämmen, die von durchfallkranken Hunden isoliert wurden, das Enterotoxin- und Hämolysinbildungsvermögen, die hämagglutinierenden und invasiven Eigenschaften sowie die O-Gruppenzugehörigkeit bestimmt.

2. SCHRIFTTUM

"E.coli-Infektionskrankheiten des Hundes"

2.1. Infektionen der Harnwege

2.1.1. Epidemiologie

E.coli-Keime sind die am häufigsten isolierten Erreger im Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen beim Hund (Klemm, 1958; Morris u. Franklin, 1939; Gould, 1965; Wettimuny et al., 1967; Osborne et al., 1972; Hubbert, 1972; Bush, 1976; Wooley u. Blue, 1976; Ling u. Gilmore, 1977; Weaver u. Pillinger, 1977; Amtsberg et al., 1979; Finco et al., 1979). Daneben werden aber auch *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., gelegentlich auch *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. oder *Enterobacter* spp. isoliert. Zum Krankheitskomplex der Harnwegsinfektionen rechnet man die Zystitis, Pyelonephritis und Urethritis. Der Anteil der E.coli-Infektionen an den gesamten Harnwegsinfektionen schwankt je nach Untersuchung zwischen 30 und 40 % (Ling u. Gilmore, 1977; Amtsberg et al., 1979). Harnwegsinfektionen durch E.coli kommen auf der ganzen Welt vor. Weibliche Hunde leiden häufiger an Harnwegsinfektionen als männliche (Bush, 1976; Kivistö et al., 1977b). Die Infektionsrate nimmt dabei ab dem Alter von 4 Jahren linear zu. Bei Hündinnen über 10 Jahre liegt die Infektionsrate bei 50 bis 75 % (Müller-Peddinghaus et al., 1977).

2.1.2. Erreger

E.coli-Keime, die Harnwegsinfektionen auslösen, müssen zur Anheftung an die Schleimhautoberfläche Fimbrien oder Pili auf der Zelloberfläche besitzen (Silverblatt, 1974; Svanborg-Eden et al., 1977). Diese Erfahrungen stammen aus Untersuchungen mit Stämmen von Menschen. Entsprechende Untersuchungen beim Hund fehlen bisher. Bei den von Hunden

mit Harnwegsinfektionen isolierten E.coli-Stämme dominieren aber ganz bestimmte O-Gruppen. Am häufigsten werden E.coli-Stämme mit den O-Antigenen 4, 6, 22 und 25 isoliert (Mannson, 1962a,b;Rhoades et al.,1971).

2.1.3. Klinik

Rocha (1963) findet nach experimenteller Erzeugung einer Pyelonephritis mit E.coli-Keimen bei allen Hunden eine Polyurie und Polydipsie, die immer mit einer Proteinurie und Leukozyturie verbunden ist. Ein großer Teil der Harnwegsinfektionen verläuft aber in der Praxis subklinisch (Müller-Peddinghaus et al.,1977). Kivistö et al. (1977b) finden bei 6,2 % der männlichen und 26,6 % der weiblichen Hunde bzw. Bush (1976) 10,3 % der männlichen und 21,8 % der weiblichen Hunde Keimzahlen und pathologische Veränderungen im Harntrakt, die auf eine manifeste Infektion schließen lassen, ohne daß die Hunde klinische Symptome zeigen.

2.1.4. Pathogenese

Für die Entstehung einer E.coli-Harnwegsinfektion sind ein Harnstau infolge Verengung der harnabführenden Wege, der vesiko-urethrale Rückfluß, Veränderungen der Hämodynamik der Nieren, Virusinfektionen oder Stoffwechselerkrankungen von großem Einfluß. Auch Harnsteine, Tumoren oder Mißbildungen kommen als Ursache für einen Harnstau in Frage (King u. Idriss,1967;Goulden,1968;Osborne et al.,1972; Corriere et al.,1972;Lettow et al.,1974;Müller-Peddinghaus et al.,1977). Daneben können E.coli-Keime selbst einen vesiko-urethralen Rückfluß auslösen, weil sie durch die Zerstörung der glatten Urethral-Muskulatur die Peristaltik verhindern (Grana et al.,1965,1968;Schoenberg et al.,1974). E.coli-Keime schädigen die Oberfläche der Blasen- und Harnröhrenschleimhaut. Dabei entstehen Schleimhautkrypten,

in denen sich die E.coli-Bakterien einnisten und ungehemmt vermehren können (Lloyd-Davies et al., 1971). Vorausgehende Virusinfektionen mit HCC-Virus dürften ebenfalls die Haftung der E.coli-Keime im Harntrakt erleichtern (Ginder, 1974). Der Anstieg der E.coli-Harnwegsinfektionen mit zunehmendem Alter erklärt sich aus dem häufigeren Auftreten obiger disponierender Faktoren, die mit Behinderungen des Harnabflusses einhergehen. Die mechanische Spülung durch die regelmäßige Miktation, bei der der Harn normalerweise komplett aus der Blase entleert wird, stellt ein bedeutender Abwehrmechanismus in diesem Bereich dar (Osborne et al., 1972; Bush, 1976).

Die E.coli-Keime stammen in der Regel von der äußeren Haut und gelangen durch Aszension von der Blase über den Harnleiter in die Niere (Gould, 1965; Prát, 1966; Brod, 1966; Kirk u. Jones, 1971; Osborne et al., 1972; Amtsberg et al., 1979). Eine hämatogene Besiedlung ist wahrscheinlich nur möglich, wenn eine zusätzliche Schädigung (z. B. traumatisch) der Niere auftritt (Jeffs u. Allen, 1962; Waisbren et al., 1967; Gold et al., 1968). Die Einschleppung der E.coli-Keime kann aber auch über die Katheterisation erfolgen (Beeson, 1958). Endometritiden sind wiederholt für Nierenerkrankungen verantwortlich gemacht worden. Obel et al. (1964) beschreiben Glomerulonephritiden bei der Pyometra der Hündin. Der Verdacht auf eine durch Endometritis verursachte Pyelonephritis besteht nach Renk (1971) bei 71 %, nach Müller-Peddinghaus et al. (1977) bei 87 % der Hündinnen. Bei männlichen Hunden gibt es einen Zusammenhang zwischen Prostatitis und Pyelonephritis (Müller-Peddinghaus et al., 1977).

2.1.5. Diagnose

Der Nachweis der E.coli-Harnwegsinfektion wird über die bakteriologische Untersuchung des Mittelstrahl-Urins geführt. Für die Harnwegsinfektion reicht aber der Erregernachweis "E.coli" noch nicht aus, sondern ausschlaggebend ist der Keimgehalt im Urin. Die Grenze zwischen einer echten Bakteriurie und einer sekundären Verunreinigung des Harns liegt bei 10^5 Keimen pro ml Harn (Kass, 1956; Bush, 1976; Kivistö et al., 1977b). Die Zahl 10^5 stellt einen Mittelwert mit Streuungen nach beiden Seiten dar. Bei Keimzahlen von über 100 000 pro ml Harn spricht man von einer signifikanten Bakteriurie als Ausdruck eines entzündlichen Geschehens im Bereich der Harnwege. Werte zwischen 10 000 und 100 000 können bereits als verdächtig betrachtet werden und sollten Anlaß für eine Nachuntersuchung sein. Erst Keimzahlen von weniger als 10 000 pro ml deuten auf nicht infizierte Harnwege hin und müssen dementsprechend als Kontamination betrachtet werden. Bei chronischen Harnwegsinfektionen sind manchmal auch Keimzahlen unterhalb des signifikanten Bereiches aussagekräftig (Lüders, 1966; Amtsberg et al., 1979).

2.2. Infektionen des Genitaltraktes (Hündin)

2.2.1. Epidemiologie

E.coli-Keime werden weltweit im Zusammenhang mit Vaginitis und Endometritis (Pyometra) der Hunde isoliert. Die Zahl der Hunde mit E.coli-Infektionen schwankt zwischen 74 bis 90 % (Asheim, 1965; Dow, 1957; Renton et al., 1971; Grindlay et al., 1973; Choi u. Kawata, 1975; Sandholm et al., 1975; Börresen u. Naess, 1977; Chaffaux et al., 1978; Kivistö et al., 1977a) und betragen bei der Vaginitis nach Hirsh u. Wiger (1977) 31 %. Die häufigste Form der E.coli-

Infektion ist die Pyometra, die in geschlossener und offener Form vorkommen kann. Ältere Hunde sind häufiger von dieser Infektion betroffen. Die Häufigkeit der Pyometra-Erkrankungen steigt stufenweise bis zum Alter von 10 Jahren an. Nach Tufvesson (1953) leiden über 25 % der Hündinnen im Alter von 8 bis 10 Jahren an Pyometra. Besonders Tiere, die noch nicht trächtig waren, sind gefährdet (Sandholm et al., 1975). Aus bisher ungeklärten Gründen wird ein Anstieg der E.coli-Pyometra im Alter von 7 Jahren beobachtet (Teunissen, 1952).

2.2.2. Erreger

Bei den E.coli-Infektionen des Genitaltraktes der Hündin werden vor allem Keime der O-Gruppen 2, 4, 6, 25 und 75 isoliert (Wilkinson, 1974; Mannson, 1962a; Rhoades et al., 1971; Grindlay et al., 1973; Choi u. Kawata, 1975; Chaffaux et al., 1978). Nach Rieck (1959), Grindlay et al. (1973), Sandholm et al. (1975), Kivistö et al. (1977a) haben E.coli-Stämme, die eine Pyometra auslösen, eine Affinität für die glatte Muskulatur sowie für das Endo- und Myometrium. Die Anheftung mittels hitzelabiler K-Antigene scheint für die Besiedlung des Uterus mit E.coli-Keimen wichtig zu sein (Sandholm et al., 1975). Diese K-Antigene wurden aber bisher noch nicht identifiziert.

2.2.3. Klinik

Polyurie, Polydipsie und vaginaler Ausfluß treten einige Wochen nach der Infektion auf (Sandholm et al., 1975; Kivistö et al., 1977a, b). Neben der sogenannten offenen Pyometra mit Ausfluß gibt es auch die geschlossene Form ohne Ausfluß (Renton et al., 1971). Im Krankheitsverlauf unterscheiden sich beide Formen nicht. Neben den nicht sehr ausgeprägten klinischen Erscheinungen findet man im Blut eine erhöhte Leukozytenzahl (Renton et al., 1971;

Kivistö et al., 1977a). Außerdem ist ein erhöhter Gammaglobulinspiegel typisch für an Pyometra erkrankte Hunde. Der Gammaglobulingehalt liegt bei $26,3 \pm 3,9$ g/l im Vergleich zu $10,0 \pm 3,7$ g/l bei gesunden Hündinnen. Den erhöhten Gammaglobulinspiegel findet man nicht bei Tieren mit einer E.coli-Harnwegsinfektion bzw. E.coli-Enteritis (Asheim, 1965; Sandholm et al., 1975).

2.2.4. Pathogenese

Die E.coli-Keime gelangen in der Regel von außen in den Uterus. Die Erreger stammen dabei aus dem Darmtrakt (Grindlay et al., 1973; Baier et al., 1953) oder aus dem Harntrakt (Sandholm et al., 1975; Kivistö et al., 1977a, b). Die Infektion erfolgt durch das Aufsteigen der Keime, und zwar zu einem Zeitpunkt, wo das Collum uteri offen bzw. die Uterusschleimhaut stark hyperämisch ist (Möller-Sörensen, 1929). Der günstigste Infektionszeitpunkt ist der Zeitraum der Läufigkeit und Trächtigkeit (Rieck, 1959).

Ovarielle Dysfunktionen scheinen ebenfalls ein prädisponierender Faktor für die Entstehung der Krankheit zu sein. 71 % der Ovarien von an Pyometra erkrankten Hunden weisen nachweisbare Veränderungen auf (Rieck, 1959). Teunissen (1952) sowie Dow (1957, 1959) sehen einen Zusammenhang zwischen einer Überproduktion von Progesteron und der Entstehung einer Pyometra. Die hormonelle Störung führt zur endometrialen Hyperplasie und anschließend erfolgt über die geöffnete Cervix die bakterielle Invasion. Die Pyometra kann experimentell durch übermäßige Applikation von Progesteron oder ihren Analoga ausgelöst werden. Voraussetzung ist aber, daß man mit einem E.coli-Stamm infiziert, der aus einer Pyometra isoliert worden war. Nomura (1983) konnte auf diese Weise ca. 91 % der Hündinnen (n = 23) künstlich infizieren.

2.2.5. Diagnose

Die Diagnose basiert auf der bakteriologischen Untersuchung in Verbindung mit Laboruntersuchungen (s. Klinik). Kranke Hündinnen weisen nach Sandholm et al. (1975) Keimzahlen zwischen 10^9 bis 10^{11} pro ml Uterusinhalt auf. Bei kranken Hündinnen wird meist nur ein hoher Keimgehalt von einer Bakterienart und kaum eine andere Bakterienart gefunden, wie dies z. B. in der normalen Vaginalflora der Fall ist (Hirsh u. Wiger, 1977).

Charakteristische Virulenzfaktoren für uteruspathogene E.coli-Keime konnten noch nicht identifiziert werden. Sandholm et al. (1975) sowie Kivistö et al. (1977a) haben im Serum pyometrakranker Hündinnen einen Antikörper gegen ein spezifisches E.coli-Antigen in der Elektrophorese nachgewiesen, der gesunden Hunden fehlte.

2.3. Infektionen des Darmtraktes

2.3.1. Epidemiologie

E.coli als Ursache von Durchfallerkrankungen wurde bisher in Deutschland, Skandinavien, Vereinigte Staaten und Frankreich beschrieben. Betroffen sind Hunde aller Altersklassen, wobei in der 4. bis 10. Lebenswoche E.coli-Durchfallerkrankungen am häufigsten beobachtet werden. Prozentzahlen über die Beteiligung der enteropathogenen E.coli am gesamten Durchfallgeschehen fehlen. Angaben über den Anteil enteropathogener E.coli an den gesamten E.coli-Isolaten schwanken zwischen 0 und 84 % (Mansi, 1961; Smith u. Halls, 1967; Josse et al., 1980; Wilk, 1981; Richter u. Hellmann, 1985).

2.3.2. Erreger

E.coli gehört zur normalen Darmflora des hinteren Darmtraktes (Colon) beim Hund. Der einfache Nachweis von E.coli in Organ- und Kotproben läßt deshalb im Hinblick auf die ätiologische Bedeutung des isolierten Stammes nur bedingt eine Aussage zu (Weiß, 1981). Vielmehr muß der isolierte E.coli-Keime bestimmte pathogene Eigenschaften besitzen, um als enteropathogenen und damit als Durchfallerreger eingestuft zu werden (Willinger, 1981). Die bei durchfallkranken Hunden isolierten E.coli-Keime gehören zu einem großen Prozentsatz den O-Gruppen 4, 25 und 42 an. Daneben werden in kleineren Zahlen enteropathogene E.coli-Keime auch aus anderen Gruppen isoliert (Rhoades et al., 1971; Grindlay et al., 1973; Wilkinson, 1974; Choi u. Kawata, 1975; Askaa et al., 1978; Chaffaux et al., 1978; Wilk, 1981; Richter u. Hellmann, 1985). Die E.coli-Keime des Hundes stammen sehr häufig aus O-Gruppen mit säuglingspathogenen Keimen (Davies, 1958; Fox et al., 1965; Rhoades et al., 1971; Wilkinson, 1974; Wilk, 1981; Richter u. Hellmann, 1985).

Bei verschiedenen von durchfallkranken Hunden isolierten E.coli-Keimen kann die Bildung von hitzestabilem Enterotoxin (ST) nachgewiesen werden (Smith u. Halls, 1967; Josse et al., 1980; Richter et al., 1984; Richter u. Hellmann, 1985). Hitzelabiles Enterotoxin (LT) wird von "E.coli-Hundestämmen" nicht gebildet. Der Anteil enterotoxinbildender E.coli-Stämme (ST) liegt bei 7,6 % (Richter u. Hellmann, 1985) bzw. 18 % (Josse et al., 1980). Wilk (1981) konnte unter ihren von durchfallkranken Hunden isolierten E.coli-Keimen keine Enterotoxinbildner nachweisen.

Mit der Hämagglutination gelingt der Nachweis von Fimbrien. Der Anteil, der in der für den Nachweis von Anheftungs-fimbrien typischen mannose-resistenten Hämagglutination

positiver Stämme ist relativ gering. Die positiven Stämme reagieren in der Serumagglutination zum Teil mit den bekannten Fimbrienantigenen K88, K99 und 937P (Wilk, 1981; Richter u. Hellmann, 1985).

Sowohl die Enterotoxinbildung als auch das Vorhandensein von bekannten Fimbrienantigenen sind keine konstanten Eigenschaften von E.coli-Keimen, die bei durchfallkranken Hunden isoliert werden. Die Hämolysinbildung scheint ebenfalls ein mittelbares oder unmittelbares Merkmal der Enteropathogenität von E.coli-Hundestämmen zu sein (Mannson, 1962a,b; Wilk, 1981). In den Untersuchungen von Rhoades et al. (1971) sind alle zu obigen O-Gruppen gehörenden E.coli-Stämme hämolytisch.

2.3.3. Klinik

Die E.coli-Durchfallerkrankungen können perakut, akut oder chronisch verlaufen (Mansi, 1961; Naglić et al., 1971; Wilk, 1981). Beim Auftreten innerhalb der ersten Lebensstage nimmt die Krankheit einen perakuten bis akuten Verlauf mit hoher Mortalitätsrate. Die Welpen sterben entweder innerhalb der ersten Lebensstage, meist ohne vorheriges Auftreten von klinischen Symptomen, oder zeigen starken Durchfall mit Verlust des Gleichgewichts- und Orientierungsvermögens mit tödlichem Ausgang nach 5 bis 6 Lebenstagen (Mansi, 1961; Fox et al., 1965; Naglić et al., 1971; Askaa et al., 1978). Bei Hunden im Alter von 5 Wochen bis 9 Monaten kommt es zur akuten haemorrhagischen Gastroenteritis (Mansi, 1961; Fox et al., 1965). Bei erwachsenen Hunden im Alter ab 9 Monaten ist die E.coli-Darminfektion durch chronischen, persistierenden Durchfall geprägt. Die Mortalitätsrate in dieser Altersgruppe liegt unter 16 % (Mansi, 1961). Im chronischen Fall stellt man gelegentlich auch rezidivierende, intermittierende Diarrhoe mit typischen Läsionen der chronischen, ulcerativen Enteritis (Fox et al., 1965), Endocarditis und Myo-

carditis (Naglić et al.,1977), Hypogammaglobulinämie (Fox et al.,1965;Olson u. Schreiber,1978) sowie Anorexie, Abmagerung und Exsikkose (Olson u. Schreiber,1978) fest.

2.3.4. Pathogenese

Die Infektion erfolgt oral. Die enteropathogenen E.coli-Keime stammen in der Regel aus latent infizierten Tieren und der kontaminierten Umgebung, wie Boden, Stallfläche, Abwasser. Über Abwasser kann es auch zu einer Kontamination von Futter und Trinkwasser kommen (Willinger,1981). Von Seiten des Tieres müssen bestimmte Voraussetzungen für den Erreger geschaffen werden, damit er sich im Darm vermehren kann. Das Angehen der E.coli-Diarrhoe wird wahrscheinlich durch Trächtigkeit, Oestrus, Futterwechsel, Jahreszeit, Umgebungsänderungen usw. beeinflusst (Davies et al.,1977).Die Übertragung der E.coli-Keime der Mütter auf das Neugeborene über Darmtrakt sowie eine Agalaktie, die zur Unterversorgung der Welpen mit Milch bzw. Milchantikörpern führt, begünstigen das Entstehen der neonatalen E.coli-Diarrhoe (Fox et al.,1965;Askaa et al.,1978). In chronischen Fällen kann durch Streßeinwirkung die Infektion aktiviert werden(Fox et al.,1965). Für das Haften der E.coli-Keime im Darm leistet möglicherweise auch eine vorausgehende Parvovirusinfektion Schrittmacherdienste (Weiß,1981).

Genaue Untersuchungen über die Pathogenese der E.coli-Diarrhoe gibt es noch nicht. Man kann aber annehmen, daß bei Stämmen, die hitzestabiles Enterotoxin bilden und Anheftungsfimbrien besitzen, das Entstehen der Infektion im wesentlichen mit den Vorgängen bei anderen Tieren zu vergleichen ist. Über den Verlauf der Pathogenese bei E.coli-Infektionen mit Keimen, die diese Virulenzfaktoren nicht besitzen, gibt es noch keine Ergebnisse.

2.3.5. Diagnose

Der Nachweis der E.coli-Diarrhoe beim Hund wird über die bakteriologische Untersuchung der Kot- und Darminhalt- bzw. Darmschleimhautproben geführt. Der alleinige Nachweis von E.coli genügt aber nicht, da E.coli-Keime auch normale Dickdarmbewohner sind. Entscheidend ist der Nachweis von Faktoren, die eine Enteropathogenität erwarten lassen, wie z. B. Enterotoxinbildung, Anheftungsfimbrien, Hämolysine, O-Gruppenzugehörigkeit. Da aber beim Hund noch keine obligate Korrelation zwischen Virulenzfaktoren und Enteropathogenität bekannt ist, müssen noch möglichst alle Faktoren in die Diagnose miteinbezogen werden, wobei sicher dem Toxinbildungsvermögen die größte Aussage zukommt.

2.4. Infektionen der Prostata

Entzündungen der Prostata durch E.coli-Keime kommen bei ca. 38 % der erwachsenen Hunde vor. Dieser Prozentsatz steigt auf ca. 66 % bei Hunden mit einer manifesten Harnwegsinfektion (Hornbuckle et al., 1978; Barsanti u. Finco, 1979; Ling et al., 1983). Neben E.coli-Keimen werden auch Mykoplasmen, Streptokokken, Staphylokokken, Klebsiellen u. a. aus dem Prostatasekret isoliert (Ling et al., 1983). Die klinischen Symptome der akuten Prostatitis äußern sich in Fieber, abnormer Gang, Schmerzen beim Kotabsetzen sowie Bauchschmerzen. Bei chronischer Prostatitis sind dagegen kaum klinische Befunde festzustellen. Die bakteriologische Diagnose der E.coli-Prostatitisinfektion ist sehr schwierig, vor allem wegen der Abgrenzung zur Harnwegsinfektion. Nach Ling et al. (1983) kann man nur dann von einer Prostatitisinfektion sprechen, wenn im Prostatasekret über 100mal mehr Keime zu finden sind, als in der Harnprobe. In jedem Fall wird zur Absicherung der Diagnose eine Wiederholung der Untersuchung gefordert.

2.5. Infektionen der Analbeutel

Bei 3053 in England und in Australien untersuchten Hunde hatten 12,5 % eine Analbeutelentzündung. In der Verbreitung werden keine Unterschiede bezüglich Geschlecht, Rasse und regionaler Häufigkeit festgestellt. Dagegen sind jüngere Tiere häufiger betroffen (Halnan, 1976a, b). In den Sekreten entzündeter Analbeutel können neben E.coli-Keimen auch Keime der Gattungen Streptococcus, Clostridium, Proteus, Staphylococcus, Micrococcus, Fusobacterium und Pseudomonas isoliert werden. Bei gesunden Tieren werden zum Teil dieselben Keime gefunden. Die Keimzahl in den entzündeten Analbeutel ist aber wesentlich höher. Bei der klinischen Untersuchung findet man Symptome, wie häufiges Kratzen, Lecken, "Rutschen" auf dem Hinterteil etc.. 75 % der ca. 3 000 untersuchten Hunde litten 7 bis 21 Tage vor dem Auftreten der ersten Symptome einer Analbeutelentzündung, an einer milden Diarrhoe. Eine kritische Phase für das Auftreten von Analbeutelentzündungen soll bei der Hündin der Zeitraum 1 bis 3 Wochen nach der Läufigkeit sein (Halnan, 1976a, b).

2.6. Sonstige E.coli-Infektionen

E.coli-Keime der O-Gruppe 2 und 6 werden als Ursache von E.coli-Septikämien beim Hund diskutiert (Grindlay et al., 1973). Da Endotoxine von gramnegativen Bakterien Aborte verursachen können, nehmen Sandholm et al. (1975) an, daß es im Gefolge von E.coli-Infektionen bei Hündinnen auch zu Aborten kommen kann. Wahrscheinlich provoziert das freiwerdende Endotoxin eine Plazentaablösung.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Herkunft der Bakterienstämme

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 182 Escherichia coli-Stämmen vorgenommen. Die Stämme stammten aus Kotproben von durchfallkranken Hunden. Die Proben wurden 1983 und 1984 von Tierärzten an die Diagnostik des hiesigen Institutes eingesandt. Die Altersverteilung der Hunde, von denen die Proben entnommen wurden, sah wie folgt aus:

Gruppe	Alter der Hunde (in Wochen)	Zahl der isolierten E.coli-Stämme
I	1 bis 12	39
II	über 12	109
III	unbekannt	34

3.1.2. Anzüchtung und Isolierung

Die Kotproben wurden zunächst direkt auf Normalagar, Blutagar (10 % Hammelblut) und Gassneragar im Verdünnungsausstrich (Dreiösenausstrich) ausgestrichen. Pro Probe wurde eine laktosepositive Kolonie zur weiteren Untersuchung auf Schrägagarkulturen angezüchtet bzw. lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei Kühlschranktemperatur gelagert. Beim Vorhandensein hämolysierender, laktosepositiver Keime wurde diesen Keimen immer der Vorzug vor den nicht hämolysierenden Keimen gegeben. Die endgültige Identifizierung der E.coli-Keime erfolgte durch die biochemische Untersuchung mit dem Enterotube (Roche).

3.1.3. Bestimmung der O-Antigene

3.1.3.1. Herstellung des Antigens

Eine Aufschwemmung des zu prüfenden E.coli-Stammes wurde auf einer Normalagarplatte ausgespatelt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C wurde der Bakterienrasen mit 4 ml PBS abgeschwemmt und 1 Stunde im Dampftopf erhitzt. Das erhitzte Antigen kam unverdünnt zur Anwendung.

3.1.3.2. O-Antiseren

Die O-Antiseren wurden durch Hyperimmunisierung von Kaninchen mit gereinigten E.coli O-Antigenen hergestellt.¹⁾ Für die O-Antigenbestimmung wurden O-Antiseren ausgesucht, die bisher bei den meisten enterotoxischen bzw. enteropathogenen E.coli-Stämmen beschrieben wurden. Im einzelnen waren dies: 02, 04, 05, 06, 08, 011, 015, 018, 020, 021, 025, 026, 027, 042, 048, 057, 058, 063, 065, 071, 073, 074, 078, 082, 083, 085, 0102, 0105, 0107, 0114, 0117, 0120, 0128, 0139, 0148, 0149, 0159,

3.1.3.3. Durchführung der Reaktion

Die Bestimmung der O-Antigene wurde mit der Röhren- langsamagglutination vorgenommen. Dazu wurden je 0,3 ml der Serumgebrauchsverdünnung (1:50) und 1 Tropfen Antigen in ein Röhrenchen pipettiert, das Gemisch geschüttelt und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ablesung mit bloßem Auge. Spontanagglutinierende Stämme wurden durch die parallel durchgeführte Reaktion mit physiologischer Kochsalzlösung erfaßt.

1). Methode nach Fey, H. (Erg. Hyg., 29, 349; 1955)

3.1.3.4. Absorptionstest

E.coli-Stämme, die mit mehreren O-Sera positiv reagierten (Ausnahme: spontanagglutinierende Stämme), wurden im Absorptionstest weiter untersucht. Dazu wurden die positiven O-Sera mit den entsprechenden, hitzeinaktivierten Antigenen der Referenzstämmen und der zu typisierenden E.coli-Stämme versetzt und die Gemische 24 Stunden bei 37°C bebrütet (absorbiert). Anschließend wurden die Agglutinate in den Seren bei 5 000 UpM für 20 Minuten abzentrifugiert und die Überstände als absorbierte Sera zur Feststellung der endgültigen O-Gruppe in der Kreuzagglutination verwendet. Durch den Vergleich der Ergebnisse in der Kreuzagglutination zwischen den Referenzstämmen und den fraglichen E.coli-Stämmen konnte dann die endgültige Einordnung in eine O-Gruppe vorgenommen werden.

3.1.4. Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest zum Nachweis der Fimbrien bzw. Pili wurde in Anlehnung an die von Duguid et al.(1966) und Jones u. Rutter(1974) beschriebene Methode durchgeführt. Als Testmaterial für die Durchführung der Hämagglutination dienten Abschwemmungen einer 12-stündigen Bakterienkultur (37°C) vom Minca-Agar nach Guinee et al.(1977). Die Erythrozyten wurden durch dreimaliges Waschen von Meerschweinchenblut gewonnen. Geprüft wurde die Fähigkeit der Hämagglutination mit einer 2 %igen Erythrozytensuspension ohne Mannose (mannose-sensitive Hämagglutination) und mit 1 % Mannose (mannose-resistente Hämagglutination). Zur Durchführung der Reaktion wurden 0,3 ml der Keimsuspension (ca. 10^{10} Keime pro ml) mit 1 Tropfen der Erythrozytenlösung (2 %) versetzt. Anschließend wurden die Gemische kräftig geschüttelt und 2 Stunden bei 8°C inkubiert. Die Ablesung erfolgte mit bloßem Auge nach den üblichen Kriterien. Zur Kon-

trolle wurde immer der hämagglutinierende E.coli-Stamm 0149:K88 mituntersucht.

3.1.5. Darmligaturtest

Die Durchführung des Darmligaturtestes erfolgte in Anlehnung an die von Baljer et al.(1975)beschriebene Technik bei 3 bis 5 Wochen alten Ferkeln. Als Testsuspension dienten jeweils 1 ml von E.coli-Bouillon-Kulturen (Tryptic Soy Broth), die 18 Stunden unter ständigem Schütteln bei 37°C bebrütet wurden. Zur Anästhesie der Ferkel wurde eine Kombination aus Hypnodil^R und Stresnil^R(Fa.Janssen) verwendet. Jeder E.coli-Stamm wurde bei 2 verschiedenen Ferkeln ausgetestet. Die Länge der Darmsegmente im Dünndarm betrug 10 cm. Zwischen den mit den Teststämmen beimpften Segmenten lagen ca. 5 cm lange, mit physiologischer Kochsalzlösung beimpfte bzw. nicht beimpfte Kontrollsegmente. Um den Empfindlichkeitsverlust zwischen dem Anfang und Ende des Dünndarmes bei der Ablesung mitberücksichtigen zu können, wurde jeweils am Anfang und Ende der Versuchsreihe der enterotoxinbildende E.coli-Stamm 0149:K88 als Positivkontrolle mitgetestet. 12 bis 14 Stunden post operationem wurden die Tiere mit Narcoren^R(IFFA Merieux) eingeschläfert und die Reaktion aufgrund der gebildeten Flüssigkeitsmenge beurteilt. Die Bewertung der Reaktion erfolgte in Anlehnung an das von Baljer et al. (1975) beschriebene Bewertungsschema von negativ bis 4+.

3.1.6. Zellkulturtest

Der Nachweis des hitzelabilen Enterotoxins wurde mit Y1-Zellen (mouse adrenal cell line) nach der Methode von Donta et al.(1974) durchgeführt. Die Y1-Zellen wurden in Ham's F10-Medium mit 10 %igem foetalen Kälberserum und Antibiotika in Zellkulturröhrchen bei 37°C angezüchtet.

Als Testmaterial diente der Überstand (3 000 UpM, 30 Minuten) einer 24-stündigen, geschüttelten Bouillonkultur (Tryptic Soy Broth), die vor der Zentrifugation noch dreimal aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Nachdem der Zellrasen dicht war, wurde das Anzuchtmedium abgegossen und der Zellrasen mit 1,8 ml Erhaltungsmedium (Ham's F10-Medium + 10 % foetales Kälberserum + Antibiotika) und 0,2 ml des vorher behandelten E.coli-Testmaterials überschichtet. Nach 18-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurde die Reaktion mikroskopisch abgelesen. Als positiv galten Zellkulturen mit den für das hitzelabile Enterotoxin typischen Zellabkugelungen. Als positiv-Kontrolle verwendeten wir den E.coli-Referenzstamm 0149:K88.

3.1.7. Babymaustest

Die Durchführung des Babymaustestes zum Nachweis des hitzestabilen Enterotoxins erfolgte nach der von Moon et al. (1978) beschriebenen Technik. 0,1 ml mit einer Farblösung (1 % Trypanblau-Lösung) versetzter Überstand (3 000 UpM, 30 Minuten) einer 24-stündigen, geschüttelten E.coli-Bouillonkultur (Tryptic Soy Bouillon) wurde mittels einer Sonde direkt in den Magen von 4 bis 6 Tage alten Babymäusen appliziert. Die Austestung jedes einzelnen E.coli-Stammes erfolgte bei 3 verschiedenen Tieren. Nach der oralen Inokulation wurden die Babymäuse 3 Stunden bei 37°C gehalten. Im positiven Fall zeigten die Tiere wässrigen Durchfall und hatten einen Gewichtsverlust von mehr als 2 % ihres ursprünglichen Körpergewichtes zu verzeichnen. Die Kontrolle des Versuchsansatzes erfolgte mit dem enterotoxinbildenden E.coli-Stamm 0149:K88.

3.1.8. Sereny-Test

Die Methodik des Sereny-Testes wurde von DuPont et al. (1971) aus-

föhrlich beschrieben. Hierbei wurden 0,05 ml der Abschwemmungen (PBS) einer 18stündigen Plattenkultur (Normalagar) der zu untersuchenden Bakterienstämme in den Konjunktivalsack erwachsener Meerschweinchen geträufelt. Bei invasiven Bakterien stellte sich nach 72 Stunden eine vorübergehende Keratokonjunktivitis ein. Nicht-invasive Stämme lösten keine Veränderungen am Auge aus. Als Positiv-Kontrolle diente ein Salmonella typhimurium-Stamm aus der Stammsammlung des hiesigen Institutes.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Nachweis von Hämolysinen

Bei 182 von Hunden mit Durchfall isolierten E.coli-Stämmen wurde die Hämolysinbildung untersucht. Aufgrund des unterschiedlichen Alters der Hunde sind die Stämme in 3 Gruppen aufgeteilt worden, nämlich in Stämme von Hunden im Alter von 1 bis 12 Wochen (Gruppe I), in Stämme von Hunden im Alter von über 12 Wochen (Gruppe II) und in Stämme von Hunden unbekannten Alters (Gruppe III). Diese Einteilung wurde vorgenommen, da die E.coli-Darminfektion je nach Alter der Tiere klinisch unterschiedlich abläuft (vgl. Schrifttum). Bei den "Zielzellen" handelte es sich um Hammelerythrozyten. Einen Überblick über die Ergebnisse vermittelt Tabelle 1.

Der Anteil der hämolysierenden E.coli-Stämme lag in allen 3 Gruppen etwa im Bereich von 40 %. In Gruppe I waren 15 von 39 Stämmen, in Gruppe II 45 von 109 Stämmen und in Gruppe III 14 von 34 Stämmen hämolysierend. Die erheblichen Unterschiede in der Zahl der Isolate zwischen der Gruppe II bzw. III und I wirkte sich interessanterweise nicht auf die prozentuale Verteilung aus. Der Anteil der hämolysierenden Stämme unter den stichprobenartig gesammelten E.coli-Stämmen war in allen Altersgruppen relativ einheitlich.

3.2.2. Nachweis von O-Antigenen

Von den 182 Stämmen ließen sich 102 Stämme in die von uns untersuchten O-Gruppen einordnen (vgl. Material und Methoden). Die übrigen 80 Stämme waren entweder spontan agglutinierende Stämme oder gehörten anderen, von uns nicht geprüften O-Gruppen an. Von den 102 typisierten Stämmen

bildeten 57 Hämolysine. Es muß in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß auch unter den nicht typisierbaren Stämmen 17 hämolysierende Stämme zu finden waren. Die Ergebnisse der O-Antigenbestimmung sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich wird, stammten die mit Abstand meisten E.coli-Stämme aus der O-Gruppe 4. 23 Stämme, das sind 22,5 % der insgesamt typisierbaren Stämme, gehörten dieser O-Gruppe an. Bis auf eine Ausnahme bildeten alle Stämme Hämolysine. Ca. 10 % der in der O-Agglutination untersuchten E.coli-Stämme entfielen auf die O-Gruppe 6, 8, 42 und 105. Dabei waren hämolysierende E.coli-Stämme unterschiedlich stark in den einzelnen O-Gruppen vertreten. Bei den O-Gruppen 6 und 83 waren es alle, bei 08, 042 und 0105 dagegen etwa die Hälfte der Stämme. Etwa 5 % der E.coli-Stämme reagierten mit den O-Seren 2 und 5, wobei auch in diesen Gruppen sowohl hämolysierende als auch anhämolysierende Stämme zu finden waren. Auf alle anderen, in Tabelle 2 aufgeführten O-Gruppen entfielen nur 1 bis 5 der insgesamt 102 typisierbaren E.coli-Stämme. Diese Stämme waren sowohl hämolysierend als auch anhämolysierend.

Zur Klärung der Frage, ob in den verschiedenen Altersgruppen E.coli-Stämme aus bestimmten O-Gruppen dominierten, wurden die E.coli-Stämme mit den am häufigsten isolierten O-Antigenen den verschiedenen Altersgruppen zugeordnet. Wegen den erheblichen Schwankungen in der Zahl der untersuchten Stämme, wurde auf Prozentangaben verzichtet (s. Tabelle 3). Eine Auswertung ist nur zwischen den Altersgruppen I und II möglich, in denen die Stämme von Hunden mit bekanntem Alter zusammengefaßt sind. Wenn man berücksichtigt, daß in der Altersgruppe II etwa dreimal soviel

Stämme getestet wurden, wie in der Altersgruppe I, so fällt auf, daß E.coli-Stämme mit den O-Antigenen 5, 42 und 83 nur bei Hunden mit einem Alter über 12 Wochen isoliert wurden. Für eine endgültige Zuordnung von E.coli-Stämmen mit einem bestimmten O-Antigen zu einer bestimmten Altersgruppe reichte aber die hier untersuchte Anzahl an E.coli-Stämmen noch nicht aus.

In 4 Problembetrieben wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten E.coli-Stämme aus Durchfallproben verschiedener Hunde typisiert. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich wird, fand man in den Betrieben zwar einzelne, dominierende E.coli O-Gruppen, und zwar z. B. im Betrieb A E.coli-Stämme der O-Gruppe 4, im Betrieb C der O-Gruppe 2. Daneben konnten aber fast immer noch E.coli-Stämme aus anderen O-Gruppen von Durchfallproben unterschiedlicher Hunde isoliert werden.

3.2.3. Nachweis von Fimbrien

Bei 28 hämolysierenden und enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen wurden mit der Hämagglutination die Frage nach eventuell vorhandenen Fimbrien untersucht. Wie aus der Tabelle 5 zu ersehen ist, zeigten nur 4 Stämme eine mannose-resistente Hämagglutination, die typisch für das Vorhandensein von Anheftungsfimbrien ist. 14 Stämme waren in der mannose-sensitiven Hämagglutination positiv und fast ebensoviele Stämme (n = 10) blieben in beiden Reaktionen negativ. Die in der mannose-resistenten Hämagglutination positiven Stämme gehörten den O-Gruppen 6 und 8 an.

3.2.4. Nachweis der Enterotoxinbildung

3.2.4.1. Darmligaturtest

Insgesamt wurden 99 E.coli-Stämme, die von durchfallkranken Hunden stammten, im Darmligaturtest beim Ferkel auf ihre Enterotoxinbildung untersucht. Unter den 99 Stämmen waren 74 hämolysierende und 25 anhämolysierende E.coli-Stämme. Die Ergebnisse des Darmligaturtestes sind im einzelnen in Tabelle 6 enthalten. Die Reaktionen wurden in negativ, fraglich und positiv (1+ bis 4+) eingeteilt.

Von den 99 getesteten E.coli-Stämmen waren 51 Stämme (51,5 %) im Darmligaturtest positiv. 48 Stämme wiesen keine oder eine fragliche Enterotoxinbildung auf. Die positiven Reaktionen entfielen dabei vor allem auf die 1+ und 2+ Reaktion. Starke Reaktionen (3+ und 4+) ließen sich bei relativ wenigen Stämmen nachweisen.

Beim Vergleich der Reaktionen zwischen hämolysierenden und anhämolysierenden Stämmen ergab sich ein ganz unterschiedliches Bild. Unter den hämolysierenden Stämmen fanden wir mehr positive Stämme, und zwar waren 63,5 % der hämolysierenden Stämme positiv. In der Gruppe der anhämolysierenden Stämme reagierten nur 16 % positiv. Der Anteil der negativen Stämme lag bei den anhämolysierenden Stämmen bei 80 %, gegenüber 27 % bei den hämolysierenden. Die starken Reaktionen (3+ und 4+) im Darmligaturtest wurden alle, mit Ausnahme eines Stammes, unter den hämolysierenden E.coli-Stämmen beobachtet.

Bei den hämolysierenden E.coli-Stämmen, die den Hauptteil der enterotoxinbildenden Keime stellten, prüften wir auch die Beziehung zwischen O-Antigen und Enterotoxinbildung. Die Tatsache, daß auch 8 Stämme, die mit den von uns ausgewählten O-Sera nicht reagierten, im Darmligaturtest positiv waren, weist daraufhin, daß das O-Antigenspektrum der enterotoxinbildenden E.coli-Stämme beim Hund relativ

groß ist. Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, daß wahrscheinlich in jeder O-Gruppe mit enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen gerechnet werden muß, denn bei der Mehrzahl der von uns untersuchten O-Gruppen wurden enterotoxinbildende Stämme gefunden. Auf der anderen Seite gab es O-Gruppen, bei denen alle untersuchten E.coli-Stämme positiv waren. Da aber die Zahl der untersuchten E.coli-Stämme in manchen O-Gruppen relativ klein war, kann diese Aussage nur mit Einschränkung gemacht werden. Es fällt auf, daß vor allem E.coli-Stämme der O-Gruppen 2, 5, 6 und 42 eine relativ starke Enterotoxinbildung aufwiesen, während z. B. Stämme der O-Gruppe 4 nur relativ schwache Reaktionen im Darmligaturtest auslösten.

3.2.4.2. Babymaustest

Mit dem Babymaustest wurden 141 E.coli-Stämme von durchfallkranken Hunden auf Enterotoxinbildung untersucht. Darunter waren 74 hämolysierende und 67 anhämolysierende E.coli-Stämme. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Der Anteil der positiven Stämme lag in beiden Gruppen (hämolysierende und anhämolysierende Keime) im Vergleich zum Darmligaturtest relativ niedrig. Bei den 74 hämolysierenden E.coli-Stämmen lösten 14,9 % und bei den 67 anhämolysierenden E.coli-Stämmen 4,5 % eine positive Reaktion im Babymaustest aus.

Von den 11 positiven hämolysierenden E.coli-Stämmen entfielen je ein Stamm auf die O-Gruppen 6 und 105, je 2 Stämme auf die O-Gruppe 5, je 4 Stämme auf die O-Gruppe 42 und 3 Stämme gehörten nicht in die von uns geprüften O-Gruppen. Bei den 3 positiven anhämolysierenden E.coli-Stämmen

men handelte es sich einmal um die O-Gruppe 8 und zwei Stämme ließen sich nicht typisieren.

3.2.4.3. Zellkulturtest

Alle 182 von Hunden mit Durchfall isolierten E.coli-Stämme prüften wir an Y1-Zellen auf die Bildung von hitzelabilem Enterotoxin (LT). Von allen Stämmen war letztlich nur ein anhämolysierender E.coli-Stamm positiv. Das hitzelabile Enterotoxin dieses E.coli-Stammes (Nr. 1497) wurde mit dem eines bekannten E.coli-Referenzstammes (0149:K88 LT⁺, ST⁺) verglichen.

Wie aus der Tabelle 9 ersichtlich wird, besaßen beide Enterotoxine etwa die gleiche Hitzeempfindlichkeit. Eine 30-minütige Erhitzung bei 98°C zerstörte die zelltoxischen Eigenschaften beider Toxine. Durch ein Antiserum, das gegen das hitzelabile Enterotoxin des E.coli-Stammes 0149:K88 hergestellt wurde, konnte das hitzelabile Enterotoxin des Teststammes 1497 neutralisiert werden.

3.2.5. Nachweis der Invasivität

41 der isolierten E.coli-Stämme (34 hämolysierende und 7 anhämolysierende Stämme) wurden im Sereny-Test auf ihre invasiven Eigenschaften untersucht. Keiner der von durchfallkranken Hunden isolierten E.coli-Stämme war positiv. Nur der zum Vergleich getestete Salmonella typhimurium-Stamm "L1" reagierte stark positiv, d. h. bei den Meerschweinchen traten innerhalb von 72 Stunden starke Konjunktividen auf.

3.2.6. Überblick

Neben der getrennten Besprechung der einzelnen Eigenschaften von den bei durchfallkranken Hunden isolierten

E.coli-Stämmen sollte abschließend ein Überblick über die verschiedenen Reaktionstypen gegeben werden. Dabei interessierte vor allem die Frage, welche Eigenschaften bei enteropathogenen Stämmen zusammen oder getrennt auftraten. Bei dieser Aufstellung wurden nur enterotoxische Stämme berücksichtigt.

Wie Tabelle 10 zeigt, besaßen die isolierten E.coli-Stämme unterschiedliche Eigenschaften. Stämme mit positiven Reaktionen im Babymaustest oder Zellkulturtest waren immer im Darmligaturtest positiv, was auf die hohe Sensibilität dieses Testes hinweist. Auch die wenigen E.coli-Stämme mit positiver mannose-resistenter Hämagglutination bildeten gleichzeitig Enterotoxin. Nur diese Stämme entsprachen in ihren biologischen Eigenschaften dem Reaktionsbild bekannter enterotoxischer E.coli-Keime (ETEC).

Von den durchfallkranken Hunden wurden aber auch E.coli-Stämme isoliert, die nur im Enterotoxinnachweis positiv waren oder die "Enterotoxin-positiv" waren und nur eine mannose-sensitive Hämagglutination zeigten. Obwohl diese Stämme nicht die notwendigen Anheftungseigenschaften aufwiesen, waren sie auch nicht invasiv.

Tab. 1: Prozentualer Anteil hämolysierender E.coli-Stämme an den Gesamtisolaten bei Hunden mit Durchfallerscheinungen

Gruppe	Alter der Hunde in Wochen	Anzahl der Stämme mit/ohne Hämolys ¹⁾			Prozentsatz der hämolysierenden Stämme
		hämolysierend	anhämolysierend	total	
I	1 bis 12	15	24	39	38,5 %
II	über 12	45	64	109	41,3 %
III	unbekannt	14	20	34	41,2 %
total		74	108	182	40,7 %

1) ausgetestet mit Hammelblutagar

Tab. 2: Ergebnisse der O-Antigenbestimmung bei E.coli-
Stämmen von durchfallkranken Hunden

O-Antigen	Gesamtzahl der positiven E.coli-Stämme	Anzahl der hämolysierenden E.coli-Stämme
2	4	2
4	23	22 (95,7 %)
5	6	4 (66,7 %)
6	9	9 (100 %)
8	12	3 (25,0 %)
11	5	0
20	1	0
21	1	0
25	1	0
26	1	0
42	10	4 (40,0 %)
48	1	0
65	1	1
73	3	0
74	1	1
82	2	0
83	5	5 (100 %)
102	1	0
105	10	5 (50 %)
107	2	0
117	3	1
total	102	57 (55,9 %)

Tab. 3: Vorkommen der am häufigsten isolierten E.coli-O-Gruppen in den verschiedenen Altersgruppen durchfallkranker Hunde

O-Antigen	Zahl der isolierten Stämme in den Altersgruppen		
	I (1 bis 12 Wochen) (n = 39)	II (über 12 Wochen) (n = 109)	III (unbekannt) (n = 34)
4	3	15	5
5	-	6	-
6	4	3	2
8	3	8	1
42	-	9	1
83	-	3	2
105	4	5	1

Tab. 4: O-Gruppenverteilung bei E.coli-Stämmen, die von durchfallkranken Hunden aus 4 Problembetrieben isoliert wurden

Betrieb	Zahl der Untersuchungen	Zahl der isolierten E.coli-Stämme bei versch. O-Gruppen									
		02	04	06	08	042	065	074	082	083	0105 sonstige ¹⁾
A	17		7		1	2	1				1 5
B	7		1					1	1	1	3
C	3			2							1
D	3	1	1			1					

1) nicht typisierbare oder spontan agglutininierende E.coli-Stämme

Tab. 5: Ergebnis der Hämagglutination bei hämolysierenden und enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen von durchfallkranken Hunden

O-Gruppe der E.coli- Stämme	n	Zahl der positiven Stämme		Zahl der Stämme mit negativer Hämagglutination
		mannose-resistente Hämagglutination ¹⁾	mannose-sensitive Hämagglutination ¹⁾	
02	2	-	-	2
04	6	-	3	3
05	3	-	1	2
06	7	2	5	-
08	2	2	-	-
042	3	-	3	-
065	1	-	-	1
unbekannt	4	-	2	2

¹⁾ Meerschweinchenerythrozyten

Tab. 6: Ergebnis des Darmligaturtestes bei E.coli-Stämmen, die von durchfall-
kranken Hunden isoliert wurden

Teststamm	n	Ergebnis des Darmligaturtestes						
		(Zahl der Stämme bei den verschiedenen Reaktionstypen)		positiv (%)				total
		negativ (%)	fraglich ¹⁾ (%)	1+	2+	3+	4+	
hämolyisierende E.coli	74	20 (27 %)	7 (9,5 %)	25	11	6	5	47 (63,5 %)
anhämolyisierende E.coli	25	20 (80 %)	1 (4 %)	2	1	1	0	4 (16 %)
total	99	40 (40,4 %)	8 (8,1 %)	27	12	7	5	51 (51,5 %)

1) Stämme, die nur bei einem der Testtiere positiv waren

Tab. 7: Überblick über die Verteilung hämolyzierender enterotoxinbildender E.coli-Stämme von durchfallkranken Hunden auf die verschiedenen O-Gruppen

O-Gruppe	n	Ergebnis des Darmligaturtestes (Zahl der Stämme bei den verschiedenen Reaktionstypen)						
		negativ	fraglich	positiv				total
				1+	2+	3+	4+	
2	2	0	0	0	1	1	0	2
4	22	5	3	13	1	0	0	14
5	4	1	0	0	1	0	2	3
6	9	0	1	2	5	1	0	8
8	3	0	0	1	1	1	0	3
42	4	0	1	0	0	0	3	3
65	1	0	0	0	0	1	0	1
74	1	0	0	1	0	0	0	1
83	5	4	0	1	0	0	0	1
105	5	2	0	2	0	1	0	3
117	1	0	1	0	0	0	0	0
nicht typisiert	17	8	1	5	2	1	0	8
total	74	20	7	25	11	6	5	47

Tab. 8: Ergebnis des Babymaustestes bei E.coli-Stämmen von durchfallkranken Hunden

Teststamm	n	Zahl der im Babymaustest positiven Stämme	Anteil der O-Gruppen an den positiven Stämmen
hämolsysierende E.coli	74	11 (14,9 %)	einmal 06 und 0105 zweimal 05 viermal 042 dreimal nicht typisiert
anhämolsysierende E.coli	67	3 (4,5 %)	einmal 08 zweimal nicht typisiert

Tab. 9: Untersuchungen über Eigenschaften eines hitzelabilen Enterotoxins von einem E.coli-Stamm, der aus der Kotprobe eines durchfallkranken Hundes isoliert wurde

Vorbehandlung des Enterotoxins ¹⁾	Prozentsatz der abgekugelten Y1-Zellen ²⁾ (cpe)	
	Enterotoxin v. E.coli 0149:K88	Enterotoxin v. E.coli "1497"
unbehandelt	100 %	100 %
Hitze- einwirkung	50°C, 30'	100 %
	60°C, 30'	80 %
	67°C, 30'	20 %
	98°C, 30'	0 %
Neutralisation mit LT-Antiserum	0 %	0 %

1) Kulturüberstand einer 18stündigen Bouillonkultur

2) 0,2 ml Enterotoxin, Inkubationszeit: 24 Std.

Tab. 10: Überblick über die biologischen Eigenschaften von E.coli-Stämmen aus
Kotproben durchfallkranker Hunde

Zahl der Stämme	O-Gruppe	Reaktionsbild					Enterotoxinbildung			Invasität
		Hämagglutination		Darmliga- turtest	Babymaus- test	Zellkul- tur (Y1)				
		mannose- resistent	mannose- sensitiv							
2	02	-	+	+	-	-	-	-	-	
3	04	-	+	+	-	-	-	-	-	
2	04	-	-	+	-	+	-	-	-	
1	05	-	+	+	-	+	-	-	-	
2	05	-	-	+	+	+	+	-	-	
1	06	+	+	+	+	+	+	-	-	
1	06	+	+	+	-	+	-	-	-	
3	06	-	+	+	-	+	-	-	-	
2	08	+	+	+	-	+	-	-	-	
3	042	-	+	+	+	+	+	-	-	
1	nicht typisiert	-	+	+	-	+	-	+	-	

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In den vorliegenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß von durchfallkranken Hunden isolierte E.coli-Stämme enterotoxische Eigenschaften besitzen und damit als Durchfallerreger beim Hund in Frage kommen. Die Eigenschaft der Enterotoxinbildung ist ein wichtiger Virulenzfaktor für E.coli-Keime, die Durchfallerkrankungen bei Mensch und Tier auslösen. Mit dem Darmligaturtest beim Ferkel ließ sich bei ca. 51 % der von durchfallkranken Hunden isolierten E.coli-Keime eine Enterotoxinbildung nachweisen. Dieser Prozentsatz lag wesentlich höher als in den vergleichbaren Untersuchungen von Smith u. Halls (1967) sowie Wilk (1981). Die Unterschiede in der Enterotoxinbildung sind schwer zu interpretieren, da es sich jeweils um andere E.coli-Isolate handelt. Smith u. Halls (1967) bezogen in ihre Untersuchungen aber nur 6 E.coli-Stämme ein. Wilk (1981) schränkte die Aussagekraft der eigenen Untersuchungen ein, da "die Endkontrollen negativ waren".

Im Enterotoxinnachweis mit dem Babymaustest reagierten nur ca. 10 % der isolierten E.coli-Stämme positiv. Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit den bisher in der Literatur beschriebenen Prozentzahlen (Richter u. Hellmann, 1985; Josse et al., 1980). Damit wurde die aus anderen Untersuchungen bekannte Tatsache bestätigt, daß der Darmligaturtest die empfindlichste Nachweismethode für enterotoxinbildende E.coli-Stämme ist (Pesti, 1971). Die höhere Nachweisrate mit dem Darmligaturtest erklärt sich vor allem aus der Tatsache, daß mit dem Darmligaturtest alle Arten des Enterotoxins nachgewiesen werden, während z. B. der Babymaustest nur zum Nachweis für bestimmte hitzestabile Enterotoxine (ST) und die Zellkultur nur zum Nachweis hitzelabiler Enterotoxine (LT) geeignet ist. Smith u. Halls (1967) sehen eine erhöhte Empfindlichkeit

des Darmligaturtestes bei Verwendung eines homologen Wirtsystems, d. h. eventuell würde sich der Prozentsatz enterotoxinbildender E.coli-Stämme nach Durchführung des Darmligaturtestes bei Hunden noch erhöhen. Die Empfindlichkeit des Hundedarmes für E.coli-Enterotoxine wurden von Pierce u. Wallace (1972) sowie Guerrant et al. (1973) nachgewiesen.

In unseren Untersuchungen gelang es erstmals beim Hund einen E.coli-Stamm nachzuweisen, der hitzelabiles Enterotoxin (LT) bildete. LT bildende Stämme wurden bisher vor allem bei ferkelpathogenen, gelegentlich auch bei menschenpathogenen Stämmen gefunden (Ørskov u. Ørskov, 1979; Gaastra u. de Graaf, 1982). Der hier isolierte Stamm konnte aber nicht in eine der bekannten O-Gruppen für enteropathogene porcine oder humane Stämme eingeordnet werden. Durch den Kreuzneutralisationstest konnten wir aber nachweisen, daß das von dem caninen E.coli-Stamm gebildete LT mit dem bekannten, von porcinen Stämmen gebildeten LT übereinstimmt. Wegen der geringen Verbreitung LT-produzierender E.coli-Stämme beim Hund, kommt aber dem Zellkulturtest bei der Differenzierung von E.coli-Stämmen des Hundes nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

Sowohl der Darmligaturtest als auch der Babymaustest sind für routinediagnostische Untersuchungen von E.coli-Stämmen zu aufwendig. Wesentlich einfacher sind Methoden, wie z. B. der Hämagglutinationstest (mannose-resistent) zum Nachweis von Anheftungsfimbrien, wie sie bovine und porcine enterotoxische E.coli-Stämme (ETEC) obligat besitzen. Die Hämagglutination (MRH) war aber nur bei einem geringen Prozentsatz der enterotoxinbildenden, caninen E.coli-Stämme positiv. Unsere Ergebnisse mit der mannose-resistenten Hämagglutination decken sich mit denen von Wilk (1981)

sowie Richter u. Hellmann (1985). Die fehlende Korrelation zwischen Enterotoxinbildung und hämagglutinierenden Eigenschaften bei den caninen E.coli-Stämmen muß nicht unbedingt bedeuten, daß canine Stämme keine Anheftungsfimbrien besitzen. Vielleicht agglutinieren E.coli-Stämme vom Hund nur Blutkörperchen von einer Spezies, die bisher noch nicht untersucht wurde. Auch die Anheftungsfimbrien der Kälber- oder Ferkelstämme agglutinieren nur Blutkörperchen von bestimmten Tierarten (Gaastra u. de Graaf, 1982). Möglicherweise existieren bei hundepathogenen E.coli-Stämmen aber ganz andere Anheftungsmechanismen, z. B. über die Typ 1 Fimbrien. Eine andere denkbare Möglichkeit wäre gewesen, daß enteropathogene E.coli-Stämme des Hundes nicht zu den adhäsiven, sondern zu den invasiven Darmbakterien gehören. Der Invasivitätsnachweis war aber bei allen Stämmen negativ, so daß eine Enteroinvasivität ausgeschlossen werden kann. Die endgültige Klärung der Pathogenese von enteropathogenen caninen E.coli-Stämmen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Ein wichtiger Punkt war auch die Klärung der Frage, inwieweit die Hämolysinbildung bei E.coli-Stämmen des Hundes mit der Enteropathogenität korreliert. In der Literatur liegen dazu sehr widersprüchliche Ergebnisse vor (Mannson, 1962a,b; Smith u. Halls, 1967; Rhoades et al., 1971; Hallmann u. Burkhardt, 1974; Wilk, 1981). Aufgrund unserer Ergebnisse können wir sagen, daß unter den hämolysierenden E.coli-Stämmen des Hundes die Enterotoxinbildung weiter verbreitet war, als bei anhämolysierenden Stämmen, und die hämolysierenden Keime sehr viel häufiger in bekannten "pathogenen" O-Gruppen vertreten waren. Daneben ließen sich aber in geringer Zahl auch unter den anhämolysierenden Keimen enterotoxinbildende Stämme aus den bekannten O-Gruppen und hämolysierende Stämme ohne Enterotoxin-

bildung isolieren. Die Hämolysinbildung war also letztlich kein konstanter Virulenzfaktor der isolierten enterotoxischen E.coli-Keime des Hundes. Die Hämolysinbildung bleibt, wie z. B. bei den ferkelpathogenen Stämmen der O-Gruppe 138, 139, 141 und 149 nur ein Anhaltapunkt für den Diagnostiker, und zwar in dem Sinn, daß bei Isolierungen hämolysepositiver E.coli- Stämme aus Durchfallproben die Wahrscheinlichkeit, den Durchfallerreger zu isolieren größer ist, als bei Isolierung eines anhämolysierenden Stammes. Ein absoluter Virulenzfaktor für enteropathogene E.coli-Stämme des Hundes ist die Hämolysinbildung nicht.

Für die Virulenz der E.coli-Keime spielt auch das O-Antigen eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, daß bestimmte O-Antigene vermehrt in Verbindung mit enterotoxischen E.coli-Keimen gefunden werden (Ørskov u. Ørskov, 1979). Die von uns isolierten E.coli-Stämme gehörten zu einem großen Prozentsatz (ca. 25 %) der O-Gruppe 4 und mit etwas geringerem Anteil den O-Gruppen 6, 8, 42 und 105 an. Diese Verteilung der O-Gruppen deckt sich mit den meisten der bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Rhoades et al., 1971; Wilkinson, 1974; Askaa et al., 1978; Wilk, 1981; Richter u. Hellmann, 1985). Nur die Befunde von Mansi (1961) weichen etwas ab. Er fand die O-Gruppe 42 am häufigsten bei E.coli-Stämmen durchfallkranker Hunde. Man darf aber trotz dieser relativ großen Übereinstimmung nicht übersehen, daß auch E.coli-Stämme anderer O-Gruppen imstande waren, Enterotoxine zu bilden, und E.coli-Stämme aus den oben genannten O-Gruppen kein Enterotoxin bildeten. Für den Diagnostiker heißt dies, daß die O-Gruppenbestimmung ebenfalls nur ein Anhaltspunkt sein kann in Bezug auf die Feststellung der Enteropathogenität eines E.coli-Stammes vom Hund.

Das Ergebnis der O-Gruppenbestimmung hat auch wichtige Konsequenzen für eine ins Auge zu fassende Entwicklung von E.coli-Oralimpfstoffe für Hunde, wie sie bei anderen Tierarten bereits in der Praxis erfolgreich eingesetzt werden (Baljer, 1977, 1978). Mit der hier festgestellten Verteilung der O-Antigene unter den enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen des Hundes könnte man mit einer polyvalenten E.coli-Oralvaccine, die die O-Antigene 4, 6, 8 und 42 enthielt, ca. 50 bis 60 % der E.coli-Infektionen in der Praxis abdecken. Dieser Prozentsatz ist relativ hoch und rechtfertigt durchaus die Entwicklung einer entsprechenden Vaccine. Einen E.coli-Impfstoff auf der Basis von O-Antigen für Hunde zu entwickeln, der alle E.coli-Darminfektionen abdeckt, wird wegen der Vielfalt der möglichen O-Antigene bei enterotoxischen E.coli-Keimen des Hundes ebensowenig möglich sein, wie bei anderen Tierarten. Auch beim Hund müssen deshalb entsprechende zwingerspezifische Vaccinen bzw. Autovaccinen den polyvalenten Impfstoff ergänzen. Impfstoffe auf der Basis anderer Antigene sind derzeit noch nicht denkbar, da entsprechende serotypübergreifende Antigene bisher bei E.coli-Stämmen des Hundes noch nicht isoliert bzw. identifiziert wurden.

E.coli-Darminfektionen treten bei Hund und Mensch, im Gegensatz z. B. zu Ferkel und Kalb, nicht nur in der Neugeborenenphase, sondern auch im Erwachsenenalter auf. Es war deshalb interessant zu untersuchen, ob in den verschiedenen Altersgruppen auch unterschiedliche E.coli-Stämme auftraten. Wir konnten aber keine deutlichen Unterschiede in den biologischen Eigenschaften und in der O-Antigenverteilung zwischen E.coli-Stämmen, die bei Welpen isoliert wurden, und E.coli-Stämmen von erwachsenen Hunden feststellen. Bei Erwachsenen scheinen dieselben E.coli-

Stämme Darminfektionen auszulösen wie bei Jungtieren. Damit bestätigen sich auch Erfahrungen aus der Praxis, wonach erwachsene Tiere, vor allem Elterntiere, sehr häufig die Infektionsquellen für Jungtiere sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei E.coli-Stämmen, die von durchfallkranken Hunden stammten, wurden das O-Antigen, die Hämolysinbildung, die Enterotoxinbildung und die hämagglutinierende Eigenschaft bestimmt. Als Nachweismethoden dienten zur O-Antigenbestimmung die Röhrchenlangsamagglutination und zur Enterotoxinbildung der Darmligaturtest, Babymaustest und Zellkulturtest.

Bei 102 von 182 isolierten Stämmen ließ sich das O-Antigen bestimmen. Von den 102 typisierbaren Stämmen gehörten 22,5 % der O-Gruppe 4 und jeweils ca. 10 % den O-Gruppen 6, 8, 42 und 105 an. Die übrigen Stämme verteilten sich auf insgesamt 16 verschiedene O-Gruppen.

Die Nachweisrate enterotoxinbildender Stämme hing von dem verwendeten Test ab. Im Darmligaturtest waren 51,5 % der Stämme positiv und im Babymaustest 10 %. Nur ein E.coli-Stamm bildete im Zellkulturtest nachweisbares, hitzelabiles Enterotoxin (LT).

Mannose-sensitive, hämagglutinierende Eigenschaften besaßen 14 der getesteten E.coli-Stämme. Dagegen reagierten in der mannose-resistenten Hämagglutination nur 4 % der Stämme positiv.

Eine obligate Korrelation zwischen der Enterotoxinbildung und bestimmten O-Antigenen bzw. biologischen Eigenschaften ließ sich nicht feststellen. Enterotoxinbildende Stämme waren aber sehr viel häufiger hämolysierend und stammten häufiger aus den O-Gruppen 4, 6, 8 und 42 als anhämolysierende E.coli-Stämme.

SUMMARY

Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from dogs with diarrhoea.

E. coli strains which were isolated from dogs with diarrhoea were characterized according to their O-antigen, hemagglutinating property, hemolysin and enterotoxin production. O-antigens were proven by tube agglutination test and enterotoxic properties by ligated gut loop test, the infant mouse test and cell culture test. Guinea pig erythrocytes were used for hemagglutination test.

102 out of 182 isolated *E. coli* strains were typable with specific-antisera of 37 O-groups. 22,5 % of typable strains belonged to O-group 4 and about 10 % to each of the O-groups 6, 8, 42 and 105. The remaining strains were distributed among 16 different O-groups.

The isolation rate of enterotoxic *E. coli* depended from the proof method. 51,5 % of the strains were positive in intestinal ligated gut loop test and 10 % in baby mouse test. Only one strain produced heat labile enterotoxin (LT) demonstrable in cell culture test.

14 *E. coli* strains possessed "mannose-sensitive" hemagglutinating properties. 4 strains reacted positively in "mannose-resistant" hemagglutination.

A consistent correlation between enterotoxic and hemolytic properties and distinct O-groups could not be demonstrated, but enterotoxic strains were more often hemolytic and originated more frequently from O-groups 4, 6, 8 and 42 than anhemolytic strains.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Amtsberg, G., W. Stäcker, R. Müller-Peddinghaus und G. Kirpal, 1979: Beitrag zur Ätiologie und Diagnostik von Harnwegsinfektionen beim Hund
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 358-364.
- Asheim, A., 1965: Pathogenesis of renal damage and polydipsia in dogs with pyometra.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 147, 736-745.
- Askaa, J., K.B. Jacobsen, M. Sørensen, 1978: Neonatal infections in puppies caused by *Escherichia coli*, serogroups.
Nord. Vet. Med. 30, 486-488.
- Baier, M., J. Kalich und J. Taxacher, 1953: Über Pathogenese und Behandlung der Endometritis bei Hündinnen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 66, 397-403.
- Baljer, G., S. Chorcherr, E. Sickel und D. Giessen, 1975: Orale, akute Immunisierung neugeborener Ferkel gegen *Escherichia coli*; Wirksamkeitsnachweis im Darmligaturtest.
Zbl. Vet. Med. B 22, 488-498.
- Baljer, G., 1977: Erfahrungen mit der oralen Schutzimpfung von Kälbern gegen *Escherichia coli*.
Tierärztl. Umsch. 10, 527-537.
- Baljer, G., 1978: Möglichkeiten der Immunprophylaxe gegen *Escherichia coli* beim Ferkel.
Prakt. Tierarzt 10, 788-792.
- Barsanti, J. A. and D. R. Finco, 1979: Canine bacterial prostatitis.
Vet. Clin. North. Am. 9, 679-700.
- Beeson, P. B., 1958: The case against the catheter.
Amer. J. Med. 24, 1-3.
- Børresen, B. and B. Naess, 1977: Microbial, immunological and toxicological aspects of canine pyometra.
Acta. Vet. Scand. 18, 569-571.

Brot, J.: Infektionswege bei der Pyelonephritis. In: Pyelonephritis.

Forschungsergebnisse 1966, 1-9; H. Losse und M. Kienitz, Thieme, Stuttgart.

Bush, B.M., 1976: A review of the etiology and consequences of urinary tract infections in the dog.

Br. Vet. J. 132, 632-641.

Chaffaux, S., J.M. Person and L. Renault, 1978: Étude bactériologique de l'infection utérine des carnivores domestiques.

Rec. Méd. Vet. 154, 465-471.

Choi, W.-P. and K. Kawata, 1975: O group of Escherichia coli from canine and feline pyometra.

Jpn. J. Vet. Res. 23, 141-143.

Corriere, J.N., J.M. McClure and L.I. Lipschultz, 1972: Contamination of bladder urine by urethral particles during voiding: Urethrovesical reflux.

J. Urol. 107, 399-401.

Davies, M.E., 1958: Some observations on the antigenic structure of Escherichia coli isolated from the dog.

Br. Vet. J. 114, 198-200.

Davis, C.P., D. Cleven, E. Balish and C.E. Yale, 1977: Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs.

Appl. Environ. Microbiol. 34, 194-206.

Donta, S.T., H.W. Moon and S.C. Whipp, 1974: Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture.

Science 183 (25), 334-336.

Dow, C., 1957: The cystic hyperplasia pyometra complex in the bitch.

Vet. Rec. 69, 1409-1415.

Dow, C., 1959: Experimental reproduction of the cystic hyperplasia pyometra complex in the bitch.

J. Path. Bact. 78, 267-278.

- Duguid, J.P., E.S. Anderson and J. Campbell, 1966: Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae.
J. Path. Bact. 92, 107-138.
- DuPont, H.L., S.M. Formal, R.B. Hornick, M.J. Snyder, J.P. Libonati, D.G. Sheahan, E.H. Labrec and J.P. Kalas, 1971: Pathogenesis of Escherichia coli diarrhoea.
N. Engl. J. Med. 285, 1-9.
- Finco, D.R., E.B. Jr. Shotts and W.A. Crowell, 1979: Evaluation of methods for localization of urinary infection in the female dog.
Amer. J. Vet. Res. 40, 707-712.
- Fox, I.W., W.G. Hoag and J. Strout, 1965: Breed susceptibility, pathogenicity and epidemiology of endemic coliform enteritis in the dog.
Lab. Anim. Care 15, 194-200.
- Gaastera, W. and F. de Graaf, 1982: Host specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic Escherichia coli strains.
Microbiol. Rev. 46, 129-161.
- Ginder, D.R., 1974: Urinary tract infection and pyelonephritis due to Escherichia coli in dogs infected with canine adenovirus.
J. Infect. Dis. 129, 715-718.
- Gold, A., R.D. Jeffs and R.B. Wilson, 1968: Experimental pyelonephritis in dogs.
Can. J. comp. Med. 32, 450.
- Gould, J.C., 1965: Quantity and quality in the diagnosis of urinary tract infections.
Br. J. Urol. 37, 7-12.
- Goulden, B.E., 1968: Vesico-ureteral reflex in the dog.
New Zeal. Vet. J. 16, 167-175.
- Grana, L., J. Kidd, F. Idoriss and O. Swenson, 1965: Effect of chronic urinary tract infection on ureteral peristalsis.
J. Urol. 94, 652-657.

Grana, L., W.L. Donnellan und O. Swenson, 1968: Effects of gram-negative bacteria on urethral structure and function.

J. Urol. 99, 539-550.

Grindlay, M., J.P. Renton and D.H. Ramsay, 1973: O-group of *Escherichia coli* associated with canine pyometra.

Res. Vet. Sci. 14, 75-77.

Guerrant, R.L., U. Ganguly, A.G.T. Casper, E.J. Moore, N.F. Pierce and C.C.J. Carpenter, 1973: Effect of *Escherichia coli* on fluid transport across canine small bowel; Mechanism and time-course with enterotoxine and whole bacteria cells.

J. Clin. Invest. 52, 1707-1714.

Guinee, P.A.M., J. Veldkamp and W.H. Jansen, 1977: Improved Minca Medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 15, 676-678.

Hallmann, L. und F. Burkhardt, 1974: Klinische Mikrobiologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 97-102 u. 551-576.

Halnan, C.R.E., 1976a: The diagnosis of anal sacculitis in the dog.

J. Small Anim. Pract. 17, 527-535.

Halnan, C.R.E., 1976b: The frequency of occurrence of anal sacculitis in the dog.

J. Small Anim. Pract. 17, 537-541.

Hirsh, D.C. and N. Wiger, 1977: The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates.

J. Small Anim. Pract. 18, 25-30.

Hornbuckle, W.E., D.M. MacCoy, G.S. Allan, 1978: Prostatic disease in dogs.

Cornell Vet. 68, 284-305.

Hubbert, W.T., 1972: Bacteria and spermatozoa in the canine urinary bladder.

Cornell Vet. 62, 13-20.

Jeffs, R.D. and M.S. Allen, 1962: The relationship between urethrovvesical reflux and infection.

J. Urol. 88, 691-695.

Jones, G.W. and J.M. Rutter, 1974: The association of K88 antigen with haemoagglutinating activity in parvovine strains of *Escherichia coli*.

J. Gen. Microbiol. 84, 135-144.

Josse, M., E. Jalquemin and A. Kaeckenbeeck, 1980: Présence chez le chien, d'*Escherichia coli* productrices d'une enterotoxine thermostable (STa).

Détermination der leur sensibilité aux antibiotiques.

Ann. Med. Vet. 124, 211-214.

Kass, E.H., 1956: Asymptomatic infections of the urinary tract.

Trans. Ass. Am. Physns. 69, 56.

King, L.R. and F.S. Idriss, 1967: The effect of vesico-ureteral reflex on renal function in dogs.

Invest. Urol. 4, 419-427.

Kirk, R.W. and W.O. Jones: In Current Veterinary Therapy IV Small Animal Practice; p. 689. Ed. Kirk, R.W.,

Philadelphia: W. B. Saunders. (1971)

Kivistö, A.-K., H. Vasenius and M. Sandholm, 1977a: Laboratory diagnosis of canine pyometra.

Acta Vet. Scand. 18, 308-315.

Kivistö, A.-K., H. Vasenius and M. Sandholm, 1977b: Canine bacteruria.

J. Small Anim. Pract. 18, 707-712.

Klemm, O., 1958: Keimarten und Keimzahlen bei Spontan- und Katheterharnproben von Hunden.

Vet. Diss., F. U. Berlin

Lettow, E., D.M. Schwarz-Porsche, A. v. Recum und W. Jahn, 1974: Ektope Ureterenmündungen in den Harntrakt und Nierendystrophie beim Hund. Zwei Beiträge zur Kasuistik.

Zbl. Vet. Med. A 21, 39-61.

- Ling, G.V. and T. Gilmore, 1977: Penicillin Gor ampicillin for oral treatment of canine urinary tract infections. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 171, 358-361.
- Ling, G.V., J.E. Branam, A.L. Ruby and D.L. Johnson, 1983: Canine prostatic fluid: Techniques of collection, quantitative bacterial culture, and interpretation of results. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 183, 201-206.
- Lloyd-Davies, R.W., J.C. Lee and F.Jr. Hinman, 1971: Urothelial micro-contour. II. Intracellular crypts and secretory substances. J. Urol. 106, 75-80.
- Lüders, D.: Bakteriologische Diagnostik. In: Pyelonephritis. H. Losse und M. Kienitz, Thieme, Stuttgart, 1966, S. 97-112.
- Mansi, W., 1961: Is E.coli (Bacterium coli) infection of significance in the dog? Adv. Small Anim. Pract. 3, 29-38.
- Männson, I., 1962a:I. Haemolytic Escherichia coli serotypes isolated from pigs, cattle, dogs and cats. Acta Vet. Scand. 3, 65-78.
- Männson, I., 1962b:II. Biochemical properties of haemolytic E.coli strains belonging to O-groups 138, 139 and 141. Acta Vet. Scand. 3, 79-87.
- Möller-Sörensen, A., 1929: Einige Untersuchungen über die Endometritis chronica bei der Hündin und der Katze. Tierärztl. Umsch. 35, 529-549.
- Moon, H.W., P.Y. Funq, S.C. Whipp and R.F. Isaacson, 1978: Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice to heat stable enterotoxin of Escherichia coli: Assay modifications. Infect. Immun. 20, 36-39.

- Morris, M.L. and C.E. Franklin, 1939: Etiology of canine cystitis.
North. Amer. Vet. 20, 52-53.
- Müller-Peddinghaus, R., G. Kirpal, B. Schaefer and G. Trautwein, 1977: Untersuchungen über die Pyelonephritis des Hundes.
Zbl. Vet. Med. B 24, 198-217.
- Naglić, T., M. Hajsig, M. Herceg, M. Jakovina and M. Bauer, 1977: Colibacillosis in newborn puppies.
Vet. Arh. 47, 153-160.
- Nomura, K., 1983: Canine pyometra with cystic endometrial hyperplasia experimentally induced by E.coli inoculation.
Jpn. J. Vet. Sci. 45, 237-240.
- Obel, A.-L., L. Nicander and A. Åsheim, 1964: Light and electron microscopical studies of the renal lesion in dogs with pyometra.
Acta Vet. Scand. 5, 146-178.
- Olson, M.R. and A. R. Scheiber, 1978: Escherichia coli 09.H. as a probable cause of chronic diarrhea in a Basenji (a case report).
Vet. Med. Small Anim. Clin. 1291-1292.
- Ørskov, F. and I. Ørskov, 1979: Special Escherichia coli serotypes from enteropathies in domestic animals and man.
Fortschr. Vet. Med. 29, 7-14.
- Osborne, C.A., D.G. Low and D.R. Finco, 1972: Canine and feline urology.
Saunders, Philadelphia.
- Pesti, L., 1979: Escherichia coli infections in piglets.
Fortschr. Vet. Med. 29, 33-51.
- Pierce, N.-F. and C.K. Wallace, 1972: Stimulation of jejunal secretion by a crude Escherichia coli enterotoxin.
Gastroenterol. 63, 439-448.

Prát, V.: Die Infektionswege. In: Pyelonephritis.

H. Losse und M. Kienitz, Stuttgart, 9-19, 1966.

Renk, W., 1971: Beziehungen von Veränderungen der Prostata und Metritiden zu den Entzündungen des Harnapparates beim Hund.

Beitrag zur Pathogenese der Pyelonephritis.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 281-286.

Renton, J.P., T.A. Douglas and C. Watts, 1971: Pyometra in the bitch.

J. Small Anim. Pract. 12, 249-254.

Rhoades, H.E., S.P. Saxena and R.C. Meyer, 1971: Serological identification of Escherichia coli isolated from cats and dogs.

Can. J. Comp. Med. 35, 218-223.

Richter, Th, S. Grund und E. Hellmann, 1984: Zum Vorkommen enterotoxischer E.coli beim Junghund.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 37-43.

Richter, Th. und E. Hellmann: Vorkommen und Eigenschaften enterotoxinbildender Escherichia coli-Stämme beim enteritiskranken Junghund.

Zbl. Vet. Med. B 32, 446-453 (1985)

Rieck, G.W., 1959: Studien zur pathologischen Histologie, Pathogenese und Ätiologie des Pyometra-Endometritis-komplexes der Hündin.

IV. Die Ätiologie

Zbl. Vet. Med. 6, 575-602.

Rocha, H., 1963: Experimental pyelonephritis: Characteristics of the infection in dogs.

Yale J. Biol. Med. 36, 183-190.

Sandholm, M., H. Vasenius and A.-K. Kivistö, 1975: Pathogenesis of canine pyometra.

J. Amer. Vet. Med. Assoc. 167, 1006-1010.

Schoenberg, H.W., P. Beisswanger, W.J. Howard, H. Kligen-
maier, C.F. Walter and J.J. Murphy, 1974: Effect of
lower urinary tract infection upon urethral function.
J. Urol. 92, 107-108.

Silverbaltt, F.J., 1974: Host-parasite interactions in the
rat renal pelvis: A possible role for Pili in the patho-
genesis of pyelonephritis.
J. Exp. Med. 140, 1696-1711.

Smith, H.W. and S. Halls, 1967: Observations by the ligated
intestinal segment and oral inoculation methods on
Escherichia coli injections in pigs, calves, lambs and
rabbits.
J. Path. Bact. 93, 499-530.

Svanborg-Eden, C., B. Eriksson and L.A. Hanson, 1977: Ad-
hension of Escherichia coli to human uroepithelial
cells in vitro.
Infect. Immun. 18, 767-774.

Teunissen, G.H.B., 1952: The development of endometritis
in the dog and the effect of oestradiol and progeste-
rone on the uterus.
Acta Endocrinol. 9, 404-420.

Tufvesson, G., 1953: Operativ behandling av pyometra hos
hund.
Nord. Vet. Med. 5, 273.

Waisbren, B.A., G. Hensley, L. Lutsky and S. Farmer, 1967:
Experimental interstitial nephritis in the dog.
J. Lab. Clin. Med. 70, 989.

Weaver, A.D. and R. Pillinger, 1977: Lower urinary tract
pathogens in the dog and their sensitivity to chemo-
therapeutic agents.
Vet. Rec. 101, 77-79.

Weiß, R., 1981: Bakteriologische Erhebungen an Kotproben
von Parvovirus-positiven und -negativen Hunden.
Der praktische Tierarzt 62, 35-38.

Wettimuny, S.G. de S., 1967: Pyelonephritis in the dog.

J. Comp. Path. 77, 193-197.

Wilk, S., 1981: Untersuchungen zur Biochemie, Serologie, Enteropathogenität und Antibiotikaresistenz von Escherichia coli-Stämmen gesunder und enteritiskranker Hunde.

Vet. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

Wilkinson, G.T., 1974: O-groups of E.coli in the vagina and alimentary tract of the dog.

Vet. Rec. 94, 105.

Willinger, H.: Escherichia coli. In: Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren, Band III, 257-343 (1981)

H. Blobel und T. Schließer, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Wooley, R.E. and J.L. Blue, 1976: Quantitative and bacteriological studies of urine specimens from canine and feline urinary tract infections.

J. Clin. Microbiol. 4, 326-329.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gebotene Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. G. Baljer bedanke ich mich für die jederzeit gewährte wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in seinem Labor für das angenehme Arbeitsklima und für ihre stets freundliche Hilfe.

LEBENS LAUF

Name: Saito Michihiro

Geboren: am 6. Oktober 1958 in Tochigi,
Japan

Vater: Saito Teruo

Mutter: Saito Sumi, geb. Takenouchi

Elementarschule: vom 1965 bis 1971

Mittelschule: vom 1971 bis 1974

Höhere Schule: vom 1974 bis 1977 in Tochigi

Studium: vom April 1977 bis März 1981
an der tierärztlichen Fakultät
der landwirtschaftlichen, tier-
ärztlichen Hochschule Obihiro,
Hokkaido, Japan
(abgeschlossen mit dem Staats-
examen im März 1981)

Magister-Kurs: vom April 1981 bis September 1982
vom August 1983 bis März 1984
an der oben genannten Hochschule
(abgeschlossen mit der Magister-
prüfung im März 1984)

Studium in
Deutschland: vom Oktober 1982 bis Juli 1983

